

(19) Japan Patent Office

(12) Publication of Patent Disclosure

- (51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00
C 12 N 5/00
Classification No.
Internal Control No.:
7115-4B
- (11) Publication of Patent
Application
Sho 63-14693
- (43) Publication date:
January 21, 1988
Certification
request/Non-
certification request
Number of inventions: 4
(Altogether 11 page(s))
- (54) Title of invention:
Plant virus RNA vector
- (21) Patent application: Sho
61-158443
- (22) Date filed: July 4,
1986
- (72) Inventor(s):
Name: Okada, K.
Address: Tokyo-to,
Shinjuku-ku, 6-2 Ban 4-
203 Go
Name: Han, K.
Address: Tokyo-to,
Bunkyo-ku, Koishigawa
4-14 Ban 24-310 Go
- (71) Applicant:
Name: Sumitomo Kagaku
Kogyo Kabushiki Kaisha
Address: Osaka-fu,
Osaka-shi, Higashi-ku,
Kitahama 5 Chome 15
Banchi
- (71) Applicant:
Name: Kyowa Hakko Kogyo
Kabushiki Kaisha
Address: Tokyo-to,
Chiyoda-ku, Otemachi
1 Chome 6 Ban 1 Go
- (74) Agent: Shoseki, K. and
one other

Specification

1. Title of invention

Plant virus RNA vector

2. Scope of patent claim(s)

This is a method for incorporating external genes to the plant cells wherein:

- (1) it is composed of a plant RNA vector which is constructed by means of the substitution of the Tobamo virus RNA coat protein gene region with external genes, and
 - (2) it is composed of a transfer vector which serves to transfer the Tobamo virus RNA in an arrangement such that the Tobamo virus RNA coat protein gene region is substituted with external genes, and
 - (3) it is a transfer vector which falls within the scope of item 2 of the Scope of Patent Claim(s) in which the duplication commencement region, the selected marker, promoter and coat protein gene region are formed from the cDNA of the Tobamo virus RNA in a substitution arrangement with the external genes, and
 - (4) it is a transfer vector which falls within the scope of items 2 and 3 of the Scope of Patent Claim(s) wherein the promoter is a promoter of the (lambda) phage.
- Handwritten notes:*
must include 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100

(5) This is a universal transfer vector wherein, owing to the fact that the duplication commencement region, the selected marker, and the promoter, as well as the coat protein gene region are formed from the cDNA of the (Tobamo) virus RNA arranged in an exchange towards the restricted enzyme inoculation position for the insertion of the external gene, and is connected so that the transfer commencement nucleoside of the referenced promoter is the first nucleoside of the referenced cDNA.

(6) This is a universal transfer vector which falls within the scope of item 5 of the Scope of Patent Claim(s), and which is specified as a pLDCS29.

(7) This is a method for incorporating the external genes to the plant cells by means of substituting the coat protein gene region of the Tobamo virus RNA with external genes or through the inoculation of the reformed virus utilizing said plant RNA vector.

3. Description of invention.

Industrial applications

This invention is concerned with a method for the manufacture of a plant virus RNA vector, the transfer of said vectors through the utilization of the referenced RNA vector as well as with a method for introducing external genes to the plant cells.

Prior art technology

The Tobamo virus is a rod-shaped RNA virus which is ^{isolated} separated from such plants as tobacco, tomatoes, cow peas, cucumbers, etc. The tobacco mosaic virus (TMV) which concentrates in tobacco and tomatoes, etc. as well as the cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) etc. which concentrates in cucumbers, etc. belong to this family. PMV is an ordinary type which can be easily separated from tobacco, and several other varieties separated from tomatoes and cow peas are known as the tomato type and cow pea type.

Already, identification has been made of the base arrangement of several types of Tobamo viruses, including the tomato type (TMV-L) variety, and the slightly toxic TMV-L_{11A} variety, etc., concerning which reports have already been made (e.g. Nishiguchi et al.: Nucleic acids res. 13,5585 (1985) Okada: (Saiho Kogaku) Vol. 4, no. 11 p 979-990 1985)).

In addition to the length of TMV-L type and TMV-L_{11A} type RNA, an entire length of cDNA is formed, this constituting cloning towards the transfer vector pPM1 developed by Ahlquist et al. After this has been made linear, an in vitro transfer reaction is accomplished with the B-coli RNA polymerase, thereby accomplishing the replication of the infectious TMV RNA.

This invention has the objective of being utilized in the plant vectors used in the character substitution of Tobamo virus RNA for plant cells, in pursuit of which studies were accomplished resulting in this invention.

Outline of invention:

This invention offers a method for the production of an RNA vector utilized in the introduction of external genes to plant cells, as well as for the production of transfer vectors utilized in the construction of said RNA vectors, which offers a method for introducing external genes towards the plant cells.

Concrete explanation of this invention

The RNA vector described by this invention can be produced through the substitution of the coat protein gene region of the Tobamo virus with specified external genes.

Within the genome of the Tobamo virus, it is conjectured that there are two types of proteins which are applied to the virus replication, ~~the~~ the 30K protein, and the 4 types of coat proteins which are coated therewith. Regarding the TMV, this is known to be created from the 4 types of genes composed of the 130K protein, the 180K protein which is its "read through" protein, the 30K protein, and the coat protein. The RNA vectors described by this invention can be produced through the substitution of the gene region which codes these coat proteins with the external genes.

The construction of these RNA vectors may be exemplified by the following processes:

- (1) The composition of the entire length cDNA of the virus RNA.

transfer → to

(2) The region which codes the coat protein of the entire length cDNA of the virus RNA constructs the ~~transfer~~^{transfer} vector which includes the entire length of the incorporated cDNA substituted with external genes.

(3) The referenced ~~transfer~~^{crystal} vector is made linear.

(4) ~~Transfer~~^{crystal} reaction of the linearized transfer vector is accomplished by means of RNA polymerase through ordinary means, resulting in the desired re-assembly of the RNA vector.

At this time, ~~transfer~~^{crystal} reaction is accomplished in the presence of m⁷GpppG by means of RNA polymerase. When the 5' trailing end of the RNA is blocked by "gap construction", the infectious nature of the RNA which has been re-assembled towards the plant cells increases, but the blocking of the RNA 5' trailing end with gap construction is not necessary. In addition, regarding the 3' trailing end of the RNA, at the time of the RNA ~~transfer~~^{crystal} from the cDNA by means of the ~~transfer~~^{crystal} vector, it is desirable that most of the nucleoside which passes the 3' (trailing end) do not come into contact, and that precise transfer be terminated with the 3' trailing end of the RNA. For this purpose, inoculation of the cut-off point is accomplished by means of an appropriate restricted enzyme (for example, MluI) in the immediate vicinity of the cDNA 3' (trailing end) which is a matrix. Prior to the ~~transfer~~^{crystal}, it is desirable that the ~~transfer~~^{crystal} be stopped through the cutting off of the cDNA at this point.

As the referenced ~~transfer~~^{crystal} vector, utilization may be made of already known ~~transfer~~^{crystal} vectors which include a restricted enzyme cut-off position directly below the point of insertion of the

matrix immediately following the replication commencement region, the selected marker, and promoter, as well as the transfer point of commencement, and the point of insertion of the DNA. For example, utilization may be made of the well known transfer vectors such as the pPM1 developed by Ahlquist, etc. (regarding this vector, Agrigenetics Research Associates, LTD. applied for a patent, Patent Announcement 61 (1986) - 5779). When utilizing this vector, it is essential to obtain the permission of the authorized agent. In tests of this invention, utilization was made of the pPM1 provided by Ahlquist).

The pPM1 commences from the leading end of the cDNA inserted by the transfer and includes the restricted enzyme position in the appropriate place on the trailing end of the RNA 3'. After cutting off at this point, and making it linear, the trailing end of the virus RNA 3' is surpassed by a transfer using a transfer process in which the nucleoside is not connected and which has no influence on infection.

With this invention, regarding the Tobamo virus utilized as the vector, utilization may be made of tomato virus types, ordinary types, cow pea types of TMV and CGMMV etc. It is also possible to utilize naturally transformed types which show no creation of species with respect to wild types or plants, or to utilize items which have been slightly toxified through the causing of transformations by means of re-assembly technology.

Reverse transfer can be accomplished simply by well-known methods, to reverse transfer the RNA with a reverse transfer enzyme for the entire length of the cDNA of the virus RNA. For example, it is well known that the entire length cDNA of the cDNA

of TMV-L types of genome RNA (1-6215) and the cDNA of the 3' trailing end 1.6Kb, as well as the TMV-L₁₁A type can be accomplished with the cloned plasmid pLT-D27, pL-1-13, as well as pL₁₁A-A25 etc. References to these production methods are respectively included in Ohno et al.: J. Biochem 96 1915-1923 (1984), Takamatsu et al.: Nucleic acid Res. 11, 3767-3778, 1983) and Nishiguchi et al.: Nucleic acid res. 13, 5585-5590 (1985).

The DNA utilized as a matrix in the production of the RNA vector described by this invention can be produced through the incorporation to the transfer vector of DNA in which the coat protein gene region of the entire length cDNA of the virus RNA is substituted with external gene DNA. However, the constructing of this re-assembled transfer vector itself can be accomplished through ordinary means in which utilization is made of gene re-assembly.

Particularly, the Tobamo virus RNA's cDNA coat protein gene region is removed as shown in the transfer vector pLDCS29 shown in figure 2. At this point, where it is possible to insert the external genes through the introduction of the restricted enzyme cut-off position, the constructed replication commencement region, the selected marker, and the promoter, as well as the coat protein gene region are created from the cDNA of the Tobamo virus RNA arranged in a changed arrangement towards the restricted enzyme cut-off point, owing to the introduction of the external genes.

The nucleoside which commences the transfer of the referenced promoter utilizes a universal transfer vector which is connected to the first nucleoside of the referenced cDNA, by which means it

can be readily accomplished. Through an insertion which utilizes ordinary gene re-assembly technology for the insertion of this universal vector for the insertion of external genes, the construction of the desired transfer vector can be accomplished.

There is no particular limitation as to the gene to be introduced to the plant cells and described by this invention. However, they should be improved genes with respect to high and low temperatures, frost, insect damage, disease causing organisms, virus etc, and should also be improved genes with respect to weed retardants, genes which add to the growth of plants, genes which assist in nitrogen fixation, genes which add to photosynthesis, genes which add to the nutrition and special characteristics or flavor of the plant, and genes which possess overall useful characteristics.

The character transformation of the plant cells may be accomplished through the referenced re-assembly of the RNA vectors which is infected to the plant cell. At this time, following the re-composition of the virus through the utilization of the virus coat protein, by means of inoculation towards the plant, and through the causing of infection to the plant, an increase in the infection ratio can be accomplished. Infection towards the plant cell requires water, which serves as a re-combinant reaction fluid, or mediation fluid, etc. for dilution of the concentration, following which it can easily be accomplished by means of inoculation towards the plant along with the carborundum to (illegible) the virus or RNA by means of mediation. *introduce*

As the subject plant, utilization may be made of those plants which are infected to the Tobamo virus, such as tobacco plants or tomato plants. However, it is not particularly restricted.

Hereafter explanations will be provided in detail with respect to this invention, and with reference to specific embodiments.

This invention is not limited to the applications defined in these embodiments, but may include ordinary changes in improvements in the technological applications of this invention.

Construction of the cDNA of the RNA Vector

Re-assembly cDNA which includes the cDNA in which the TMV coating protein gene region has been substituted with external genes is composed indicated hereafter. Furthermore, the cloning of the DNA in these embodiments makes utilization of the ~~E~~-coli HB101.

(1) Ban I fragments are cut out from the pBR325 (F Boulevard, Gene 4121 (1978)) which includes (Chloramphenicol acetyl transferase : CAT) genes, and following filling-in, in which utilization is made of fragments of Klenow of B-coli DNA polymerase I, and through assimilation with Sau3A, 0.74 Kb filled in BANI/Sau 3 AI fragments (which constitute the entire code region of CAT, including the non-translated 59bp 5' region as well as the non-translated 3' 24 bp region) are separated.

The well-known transfer vector - pLFW3 which inoculated the entire length cDNA of the TMV - L towards the transfer vector pPM1 (Ishigawa, etc. et al.) Dai 8 kai Nippon Bunshi Seibutsu Gakkai Nenpo (1985) is assimilated by means of Ava II, and

appropriately cut off at the 6160 of the genom of the TMV - L. Following the accomplishment of filling through the utilization of Klenow filaments in the filler bp lower flow of the cDNA of the TMV) 0.23Kb, filled in Ava II Sa I IBNA cross-sectional forms which include a 3' trailing end component of TMV as well as 22bp of coat protein genes is obtained through assimilation with Sa 1. Following the combining of these two fragments, cloning is accomplished between the BamHI of pBR 322 and Sa 1 I side whereby the pCAT 3L-10 is constructed.

The pCAT II L-10 is cut-off at the EcoRV side of the pBR 322 source, and following linearization, is cut close to the commencement coden of the CAT gene, with Bal 31 (exonuclease) in a reaction liquid which includes 0.6MNaCl, 20mMTrif-HCl(pH8) 112mNMgCl₂, 12mMCaCl₂, 11.6 (micron) gpCATL-10/EcoRV, 2.6uBal31 (exonuclease) 30 deg. C, for a reaction time of 7.5 minutes).

To this is coupled SacI (linker) pdCDAGCTCG), and following assimilation with Sac I and Sal I, cloning is accomplished between the DNA which includes the CAT genes as well as all of the 3' non-translated region of TMV between the Sac of pUC 18 and Sal I side. Utilizing a combination reaction fluid, E. coli HB101 is character transformed, resulting in the separation of plasmids from the colony resistant to ampicillin and (kororamu- (phonetic) phenecol).

The DNA arrangement is determined by means of the di-dioxide method, selection being made of CAT genes which include a 10bp 5' leader region, as well as ptC3L 5-2 which includes a portion of coat protein as well as a TMV 3' trailing end.

On the other hand assimilation is accomplished at the BftE II site within the pLFW3 coat protein gene region (appropriate to the no. 5799 of the TMV genome of the RNA. Curtailment is accomplished close to the commencement codon of the coat protein genes with Bal 31 (exonuclease) (0.6MNaCl, 20mNT riz Hcl (pH 8.0), 12mMMgCl₂, mMCaCl₂, 10 (micron) gPLFW3/Bst E II 1.3 (micron) Ba 13 1 (exonuclease) included in a reaction fluid, 30 deg. centigrade for a reaction time of 3 minutes). To this, following the joining of Sac I (linker), assimilation is accomplished with Sac I as well as Kpn I in a position appropriate to the 4390 of TMV genome Sac I in the amount of 1.25 - 1.35 Kb/Kpn I fragments, cloning being accomplished between the Sac of pUC 18 as well as Kpn I site. Following the character transformation of the B-coli in the manner described above, the plasmid is separated and a determination made of the DNA arrangement, selection being made of pt5L29, which includes 4bp continuing with a portion of 180 K protein genes as well as ATG coat protein genes having pCL29 construction:

Combining is accomplished of the Sac I/KPN II fragments of 1.32 Kb of pt 5 L29 (which includes a portion of the 180 K protein genes, the 30 K protein genes, and the commencement codon of the coat protein genes as well as its lower flow for bp, the Sac I of the 0.963 Kb of the ptC3L 5-2/Mlu I fragments (including the CAT genes and its upper flow 10 bp as well as the trailing end region of the TMV 3') as well as the Kpn I of the pLFW3/Mlu I fragments, the pCL29 thereby being constructed.

This pCL29 is constructed in such a manner that the TMV coat protein gene region of the pLFW3 is substituted with CAT genes.

Construction of pCLB29

After the pt5L29 Sac I/Kpn I fragment and pt C3L 5-2 Sac I/Mlu I fragment Sac I site are filled out with Klenow fragments, creating a smooth trailing end, they are combined in the same manner as the pCL29 construction, and a pCl of B29 is constructed.

Universal transfer vector - pLDCS 29 construction:

The coat protein gene region is removed, making it possible for this position to be inserted with the external genes, (the universal transfer vector into which it is introduced being restricted enzyme cutoff point Sac I) - PLDCF 29 being constructed as indicated hereafter.

The pLFW3 is assimilated by means of Ava II, and after filling with Klenow fragments, the Sac I (linker) is joined, being assimilated with Sac I and Mlu I, thereby simply separating 0.23 Kb Sac I/Mlu I fragments (including the TMV 3' non-translated region as well as the C trailing end 22 bp of the coat protein).

The 1.32 Kb Sac I/Kpn I fragment constituting the separation of Sac I/Mlu I fragments from pt5 L29, is combined with Kpn I/Mlu I fragments separated from the pLFW 3 (utilizing the greater part of the fragments). The coat protein gene 5710 - 6160 is removed, thereby constructing the pLDCS 29 into which has been inserted the Sac site.

criticism
criticism
~~Transfer~~: The transfer vector pCL29, pCLB29 which is constructed in the manner described above is assimilated with Mlu I following

which it is transferred by means of the commonly utilized B-coli RNA polymerase (Ahlquist et al. proc. NAS USA '81, 7066 - 7070 (1984) the resultant RNA being refined by means of phenol expulsion as well as ethanol precipitation. It is a commonly known acetic acid method: (Fraenkel - Konrat, H, virology 4, 1-4 (1957), by which the refined ordinary type TMV coat protein is utilized (4mg/ml), being maintained at 20 deg. C. in a 0.1 M phosphoric acid sodium mediation fluid (pH7.0) and treated for 16 hours, resulting in the re-formulation of the virus.

Infection and observations with regard to the plant cells.

The reaction fluid arranged and constructed in the manner described above is diluted 5 times with a mediation fluid, and is spread out on the leaves of Nicotiana glauca Samsun. Following cultivation for 10 days, the leaves are collected and an expelled fluid (250 mM Tris - HCl (pH 7.5) , 2.5 mM EDTA, 0.1 percent ascorbic acid 0.5 mM ("leupeptine" - phenetic), 1mM PMSN is added, rubbed, and heated for 10 minutes at 60 deg. C. Following centrifugal separation (14000 xg for 5 minutes), the upper cleansing forming 100 (micron) l with mediation fluid, 5 micron/l of 10mM acetyl CoA and 0.067 microns Ci of ^{14}C (label) (kororamu phenicol) (53mCi/mmol) (amashambu-phonetic) are combined and incubated for 30 minutes at 37 deg. C. The (kuroramu) phenicol and its expulsion are expelled with acetic acid ethyl and dried under low pressure following which 5 micron l of acetic acid ethyl is precipitated.

Said precipitate becomes the solution medium for chloroform/methanol (9.5:5), and is applied to a silica gel thin layer chromatography. The column phenicol as well as its acetyl

derivative 1AcCm 1-acetyl column phenocol, 3 AcCm: 3- acetyl column phenocol, 1,3 AcCm: 1, 3 - di-acetyl column phenocol examined by means of autoradiography at room temperature for 16 hours). The results are shown in Fig. 6. Within the drawings, (lane 1) represents a ladder reaction ^{14}C label column phenocol (Cm); Lane 2 represents an expelled substance of 0.5 Mg of leaves of the subject plant onto which the transfer reacting fluid has not been spread and lane 3 represents the expelled substance of the infected plant for the TMV of the wild type; Lane 4 represents a transfer substance of transfer vector pLDCS 29 which does not contain the coat protein gene, and lanes 5 and 6 represent a plant expelled substance onto which has been spread the vector substance of pCL29 pCLB29. Lane 7 represents 0.03 units of an CAT reactant.

As is clear from these results, the observation of CAT should be confirmed by means of pCL29 and pCLB 29.

Reference Examples

Construction of transfer vector - pLFW 3 which includes cDNA of the TMV - L of the entire length:

The composition of the entire length cDNA of the TMV - RNA

(1) The TMV - L type or the slightly toxic type L₁₁A is inoculated to the tobacco, and propagated. Following the rubbing of the infected tobacco, the virus granules are refined by well known means, subsequent to which the RNA from the virus granules are also refined by known means (Takamatsu et al. Nucleic Acids Res. 11, 3767 - 3778 (1983). Said RNA is annealed with a surplus

of composite primer (possessing an 18 remaining base in an appropriate arrangement of TMV - of the 9th 3' trailing end wherein A is exchanged with T). Adjustment is made of a reaction fluid which contains an annealment RNA of 50 micron g/ml as well as reverse transfer enzymes of 250 units/ml. These are then reacted for 90 minutes at 42 degrees Centigrade, thereby constituting the cDNA. Following the recovery of the DNA by means of phenol expulsion and ethanol precipitation the RNA is dispersed by means of 0.1 NNaOH. This is then applied to 5-20% alkali sho sugar density gradient centrifugation or 2.5% polyacrylamide/8.3 M urea gel electrophoresis, the appropriate cDNA being taken piecemeal to the entire length of the RNA. As indicated above, surplus composite primer on the constituted entire length cDNA (possessing an arrangement which is appropriate to the 1-19 remaining base of the TMV-RNA is added, and after heating at 90 deg. C. for 5 minutes in 10 mMTrisHCl (pH 7.5) 10 mMmgCl₂) 50 mMNaCl, it is gradually cooled and annealed.

A quantity of 250 units per ml of B-coli DNA polymerase 1 (large fragments) is added within dNTP of each of the 10 mMTrisHCl (pH 7.5), 25 mMNaCl, 10 mMgCl₂ and 5 mM (dithio 'sureito'-phonetic) 0.2mM, and reacted for 3 hours at 2 deg. C., being transformed with twin chain cDNA. Manufacture is accomplished by means of low melting point agarose gel, thereby obtaining entire length twin chain cDNA.

Cloning of the entire length cDNA.

Construction of pUCG91

In order to introduce MluI site 2pUC9 (poly linker) arrangement position, Hind III of 0.21 Kb of pCG9F2 (which includes approximately 1.6 Kb including the MluI described in Meshi et al. Virology 127, 54-64 (1983), : (Cucumber green mottle mosaic virus)/fill-in MluI fragments are inserted to the Hind III of the pUC9 (Vieda et al. Gene 19. 259-268 (1982))/(Fill-in) Sal I site, thereby constructing the pUCG91.

The construction of the MluI site circumference of the pUCG91 is shown in Fig. 5.

Construction of the plasmid pLFW1 including TMV-L type entire length cDNA.

(1) Construction of pLM51 as well as pLM31

The entire length double chain cDNA (TMV-L type) obtained in the manner described above is assimilated by means of Bgl II, manufacture being accomplished following the obtaining of the 2.62 Kb which is appropriate to the RNA 5' trailing end.

This is then joined with 3.03 Kb of AatII/Sma I fragments included in Pm promoter of pPm 1, as well as 0.47 Kb of Aat II of pUC9/BamH I fragments. The combined DNA is character transformed towards E.coli MC 1061 (Kasadaban et al. J. Mol. Biol. 138-179-207 (1980). Cloning (hybridation-phonetic) as well as restricted enzyme mapping is created, selection being made of B-coli which includes the pLM51, the construction of which is shown in Fig. 4.

(2) Construction of pLM31

The entire length twin chain cDNA obtained in the manner described above (the transformed type of cDNA in which the 9th T of the TMV-L 3'trailing end is transformed towards A) is assimilated by means of PstI, being manufactured following the obtaining of the 4.54 Kb which is appropriate to the RNA 3' trailing end.

The AatII of 2.18 Kb of pUC9/PstI fragments, as well as AatII of 0.49 Kb of pPUCG91/ fill-in MluI fragments are combined. The combined DNA being character transformed towards the E.coli MC106. Cloning hybridation as well as restricted enzyme mapping is created, selection being made of pLM31, constructed in the manner shown in Fig. 4.

(3) Construction of pLFW1

The pLFW1 which includes entire length cDNA is constructed by the insertion of Pst fragments of pLM51 (which includes Pm promoter as well as a 5' trailing end) to the Pst I site of pLM31.

Construction of pLFW3

Through the substitution of the NcoI/Apa I fragments of pLFW1 by means of NcoI/ApaI fragments of pL-1-13 (Takamatsu et al. Nucleic Acids Res. 11, 376 - 3778 (1983): approximately 1,600 bp TMV-L type 3' trailing end cDNA) and through the substitution of EcoRI/NcoI fragments by means of EcoRI/NcoI fragments of pLT- D27 (Ohno et al.: J. Biochem 96 (1915-1923) (1984): which includes cDNA of up to 6215 from TMV-Ltype RNA 5' trailing end) pLFW3 can be obtained constructed in the manner shown in Fig. 4.

Construction of pLFAI

Through the substitution of the EcoRI of pLFW1/ApaI fragments with EcoRI of pL11A-A25/ApaI fragments in the manner described above, the transfer vector pLFA1 is constructed so that the entire length cDNA of TMV-L11A type is incorporated.

(4) Brief description of drawings.

Fig. 1 is an abbreviated drawing showing the transfer vector-pCL29 construction described by this invention.

In the drawing the Pm manifests the (lambda) phage promoter of pPM1 origin developed by Ahlquist.

Here, 130k/180K, 30k and CP manifest TMV 130 k/180K tobacco genes, 30 K tobacco genes and coat protein genes. Also, 5 and 3 which are circumscribed before and aft by rectangles, manifest a 5' trailing end non-translated region as well as a 3' trailing end translated region respectively.

Fig. 2 is an abbreviated drawing showing the universal transfer vector - pLBCS29 construction.

Fig. 3 shows the transfer vector - pLFW3 DNA construction in which the transfer vector - pCL29 (p CLB 29) includes CAT genes, and transfer vector pLDCF29 as well as cDNA of RNA of the TMV is incorporated.

Fig. 4 is a diagram which shows the DNA construction of plasmid pLM31, pLM51, pLWF1, pLWF3, and pL-1-13.

Fig. 5 is a diagram which shows the DNA of the M_{Lu}I site circumference of pECG91, pLFW1, and pLFW3.

Fig. 6 is a drawing which shows the results of autoradiography resulting from tests to confirm the CAT observations.

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報(A)

昭63-14693

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑰ 公開 昭和63年(1988)1月21日

C 12 N 15/00
// C 12 N 5/00
7/00

7115-4B

7115-4B

7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 4 (全 11 頁)

⑱ 発明の名称 植物ウイルスRNAベクター

⑲ 特 願 昭61-158443

⑳ 出 願 昭61(1986)7月4日

㉑ 発 明 者	岡 田 吉 美	東京都新宿区新宿6-2番4-203号
㉒ 発 明 者	飯 哲 夫	東京都文京区小石川4-14番24-310号
㉓ 出 願 人	住友化学工業株式会社	大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地
㉔ 出 願 人	協和醸酵工業株式会社	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
㉕ 代 理 人	弁理士 諸石 光熙	外1名

明 細 書

1. 発明の名称

植物ウイルスRNAベクター

2. 特許請求の範囲

(1) トバモウイルスRNAのコートタンパク遺伝子領域を外来遺伝子で置換することにより製造した植物RNAベクター

(2) トバモウイルスRNAのコートタンパク遺伝子領域が外来遺伝子で置換された配列を有するトバモウイルスRNAを転写産物とする転写ベクター

(3) 複製開始領域、選択マーカー、プロモーターおよびコートタンパク遺伝子領域が外来遺伝子で置換された配列のトバモウイルスRNAのcDNAからなり、該プロモーターの転写開始ヌクレオチドが該cDNAの最初のヌクレオチドであるように接続されている特許請求の範囲第2項記載の転写ベクター

(4) プロモーターが1ファージのプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第2項

あるいは3項記載の転写ベクター

(5) 複製開始領域、選択マーカー、プロモーターおよびコートタンパク遺伝子領域が外来遺伝子挿入のための制限酵素切断部位へ置換された配列のトバモウイルスRNAのcDNAから成り、該プロモーターの転写開始ヌクレオチドが該cDNAの最初のヌクレオチドであるように接続されているユニバーサル転写ベクター

(6) pLDCS29として特定される特許請求の範囲第5項記載のユニバーサル転写ベクター

(7) トバモウイルスRNAのコートタンパク遺伝子領域を外来遺伝子で置換することにより製造した植物RNAベクター、あるいは該植物RNAベクターを用い再構成したウイルスを接種することを特徴とする植物細胞へ外来遺伝子を組み込む方法

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、植物ウイルスRNAベクター、該RNAベクター製造用転写ベクターおよびこれらの製

適法並びに植物細胞への外来遺伝子の導入方法に関する。

従来技術

トバモウイルス (tobamovirus) は、タバコ、トマト、ササゲ、キュウリ等の植物から分離される棒状RNAウイルスであり、タバコ、トマト等を宿主とするタバコモザイクウイルス (TMV) 及びキュウリ等を宿主とするキュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) 等がこれに属する。

TMVは、タバコから単離された普通系、トマト、ササゲから単離されたトマト系やササゲ系等の数種類があることが知られている。

すでに、トマト系TMV-L株やその弱毒株TMV-L₁₁A株等の数種類のトバモウイルスの塩基配列が決定され、報告されている(例えば、Nishiguchi et al.: Nucleic. Acids Res. 13, 5585 (1985); 岡田: 細胞工学 Vol. 4, No. 11, P. 979-990 (1985))。

また、TMV-L株およびTMV-L₁₁A株RNAの完全長cDNAを作成し、これをアールキス

ト (Abliquist) らの開発した転写ベクター p P M 1へクローニングし、これを線状化した後、大腸菌のRNAポリメラーゼでインビトロ転写反応を行い感染性TMV-RNAを再生することに成功している。

本発明らは、トバモウイルスRNAを植物細胞の形質転換に用いる植物ベクターに利用する目的で更に研究を進め、本発明を完成した。

発明の概要

本発明は、植物細胞への外来遺伝子の導入に用いるRNAベクター、該RNAベクターの製造用転写ベクターおよびこれらを製造する方法および植物細胞への外来遺伝子の導入方法を提供する。

発明の具体的説明

本発明のRNAベクターは、トバモウイルスのコートタンパク遺伝子領域を所望の外来遺伝子で置換することにより製造することができる。

トバモウイルスのゲノムには、ウイルス複製に参与しているタンパクであると推定されている2種類のタンパク、30Kタンパクおよびコートタ

- 3 -

ンパクの4種類のタンパクがコードされていることが知られており、TMVについて言えば、130Kタンパクおよびそのリードスルータンパクである180Kタンパク、30Kタンパクおよびコートタンパクの4種類の遺伝子から成り立っていることが知られている。本発明のRNAベクターは、このコートタンパクをコードする遺伝子領域を外来遺伝子で置換することにより製造することができる。

このRNAベクターの製造は、以下の工程により実施することができる。

- 1) ウイルスRNAの完全長cDNAを合成
- 2) ウイルスRNAの完全長cDNAのコートタンパクをコードする領域が外来遺伝子で置換された完全長の組み換えcDNAを含む転写ベクターを構築
- 3) 上記の転写ベクターを線状化
- 4) 線状化された転写ベクターを常法によりRNAポリメラーゼによる転写反応を行い、目的の組み換えRNAベクターを製造する。

この際、m⁷GpppGの存在下にRNAポリメラーゼにより転写反応を行い、RNAの5'末端をキャップ構造でブロックした場合には、植物細胞への組み換えRNAの感染性が顕著に増大するが、RNAの5'末端をキャップ構造でブロックすることは必須ではない。また、RNAの3'末端については、3'末端を越えて多くのヌクレオチドが接続してないことが望ましく、転写ベクターによるcDNAからのRNAの転写に際し、RNAの3'末端で正確に転写が終了することが望ましい。このために、誘型となるcDNA 3'末端の直近に適当な制限酵素(例えば、Mlu I)による切断部位を組み込み、転写の前に、そこでcDNAを切断することにより転写を停止させることが望ましい。

上述の転写ベクターとしては、複製開始領域、選択マーカー、プロモーターおよび転写開始点の直後に誘型となるDNAの挿入部位および挿入されたDNAのすぐ下流に制限酵素切断部位を有するすでに公知の転写ベクターを用いることができ

- 5 -

クターpPM
した後、大腸
ロ転写反応を
ることに成功

Aを植物細胞
利用する目的
に。

導入に用い
の製造用転
法および植
供する。

ウイルスの
米遺伝子で
きる。
ルス複製に
れている2
ブコートタ

リメラ
'末端を
植物細胞
大するが
'ックす
の3'末
スクレオ
写ベクタ
とし、R
ことが望
3'末
u1)
そこで
させる
領域、
始点の
挿入さ
を有す
ができ

る。例えば、アールキスト (Abliquist) の開発したpPM1等(本ベクターに關しアグリジエネティクス リサーチ アソシエイツ リミテッドが特許出願: 公開特許公報 昭和61年5779号を出願しており、本ベクターを要として使用する場合は、権利者の承諾を必要とする。本願発明に至る実験において、アールキスト氏から提供されたpPM1を用いた。)の公知の転写ベクターを用いることができる。

pPM1は、転写が挿入したcDNAの一端から開始し、RNAの3'末端に相当する部分に制限酵素部位を有し、この部位で切断し線状化後、転写することによりウイルスRNAの3'末端をこえて感染性に影響を与える程度の余分なスクレオチドを接続しないように工夫された転写用ベクターである。

本発明において、ベクターとして使用するトバモウイルスとしては、トマト系、普通系、ササゲ系等のTMVおよびCGMMVを用いることができる。野生株および植物に対し病徴を生じない

むことにより製造されるが、この組み換え転写ベクター自体の構築は、遺伝子組み換えで用いられる常法を用いることにより行うことができる。

特に、第2図に示した転写ベクターpLDCS29の如くトバモウイルスRNAのcDNAのコートタンパク遺伝子領域を除去し、この部分に外来遺伝子の挿入を可能にする制限酵素切断部位を導入することにより構築した複製開始領域、選択マーカー、プロモーターおよびコートタンパク遺伝子領域が外来遺伝子挿入のための制限酵素切断部位へ変換された配列のトバモウイルスRNAのcDNAから成り、該プロモーターの転写開始スクレオチドが該cDNAの最初のスクレオチドであるように接続されているユニバーサル転写ベクターを用いることにより容易に行うことができる。このユニバーサル転写ベクターの外来遺伝子挿入部位に所望の遺伝子を通常の遺伝子組み換え技術を用い挿入することにより目的とする転写ベクターを構築することができる。

本発明により植物細胞へ導入される遺伝子とし

感染性を示す自然変異株あるいは組み換え技術により変異を生じさせ増殖化したものを用いることが可能である。

ウイルスRNAの完全長のcDNAは、逆転写酵素でRNAを逆転写する公知の方法で容易に作成することができる。例えば、TMV-L株のゲノムRNA(1~6215番目)のcDNAおよび3'末端1.6KbのcDNA、並びにTMV-L₁₁A株の完全長cDNAをクローニングしたプラスミドpLT-D27、pL-1-13およびpL₁₁A-A25などが公知であり、それぞれOhno et al.: J. Biochem. 96, 1915-1923 (1984)、Takamatsu et al.: Nucleic Acids Res. 11, 3767-3778 (1983)、およびNishiguchi et al.: Nucleic Acids Res. 13, 5585-5590 (1985)に記載の方法で製造できる。

本発明のRNAベクターの製造に誘型として用いられるDNAは、ウイルスRNAの完全長cDNAのコートタンパクの遺伝子領域を外来遺伝子DNAで置換したDNAを転写ベクターに組み込

ては、特に限定されるものではないが、例えば、高温や低温に対する耐性を改善する遺伝子、霜、害虫、病原微生物、ウイルス等に対する耐性を改善する遺伝子、除草剤に対する耐性を改善する遺伝子、植物の成長に関与する遺伝子、窒素固定に関与する酵素等、光合成に関与する遺伝子、植物の栄養上の特性や風味に関する遺伝子、有用物質の遺伝子など種々の遺伝子が挙げられる。

植物細胞の形質転換は上述のようにして作成した組み換えRNAベクターを植物細胞へ感染させることにより行うことができる。この際、ウイルスのコートタンパクを用いウイルスの再構成を行った後に、植物へ接種することにより植物細胞へ感染させることにより、感染率を増大させることができる。植物細胞への感染は、再構成反応液を必要に応じ水、緩衝液等で適当な濃度へ希釈後、あるいはウイルスまたはRNAを緩衝液等で懸濁しカーボランダムと共に植物へ接種することにより行うことにより容易に行うことができる。

対象となる植物としては、例えば、タバコやト

マト等のトバモウイルスが感染しうるものであればよく、特に制限はない。

以下に実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明する。

本発明は、この実施例にのみ限定されるものではなく、本発明の技術分野において通常なされる変更および改良を含むものである。

RNAベクターのcDNAの構築

TMVのコートタンパク遺伝子領域を外來遺伝子で置換したcDNAを含む組み換えcDNAを以下のように製造した。

なお、本実施例においてDNAのクローニングには、大腸菌HB101株を用いた。

1) 完全長のクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase: CAT) 遺伝子を含むプラスミド pBR325 (F. Bolivar, Gene 4, 121 (1978)) から Ban I フラグメントを切出し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノー (Klenow) フラグメントを用いフィルインした後、Sau 3 A I で消化することにより 0.74 Kb フィールド-イン

Ban I / Sau 3 A I フラグメン (CATの全コード領域、59bpの5' 非翻訳領域および24bpの3' 非翻訳領域を含む) を単離した。

転写ベクター pPMT-TMV-L の完全長 cDNA を組み込んだ公知の転写ベクター pLFW3 (石川ら: 第8回日本分子生物学会年会 (1985)) を A v a II で消化し TMV-L のゲノム RNA の 6160 番目に相当する箇所で切断し、クレノー (Klenow) フラグメントを用いフィルインした後、更に TMV の cDNA の 4bp 下流において Sal I で消化することにより TMV の 3' 末端部分およびコートタンパク遺伝子の 22bp を含む 0.23 Kb の フィールド-イン A v a II / Sal I DNA 断片を得た。これらの2フラグメントを結合後、pBR322 の Bam H I と Sal I サイトの間にクローニングし、pCAT3L-10 を構築した。

pCAT3L-10 を pBR322 由来の EcoRV サイトで切断し、線状化した後、Ba131エキソスクレアーゼで (0.6M

- 11 -

NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8)、12mM MgCl₂, 12mM CaCl₂, 11.6μg pCAT3L-10 / EcoRV, 2.6u Ba131エキソスクレアーゼを含む反応液中、30℃、7.5分間反応) CAT遺伝子の開始コドンの近くまで切り結めた。これに Sac I リンカー (p d C G A G C T C G) を接続し、Sac I および Sal I で消化した後、CAT遺伝子およびTMVの全3' 非翻訳領域を含むDNAをpUC18のSac I および Sal I サイトの間にクローニングした。結合反応液を用い E. coli HB101 を形質転換し、アンピシリンおよびクロラムフェニコールに耐性のコロニーからプラスミドを単離した。ダイデオキシ法でDNA配列を決定し、10bpの5' リーダー領域を含むCAT遺伝子およびTMVの3' 末端およびコートタンパクの一部を含む pIC3L5-2 を選択した。

一方、pLFW3 コートタンパク遺伝子領域中の B a i E II サイト (TMVゲノムRNAの57

- 12 -

99番目に相当する部位) で消化し、Ba131エキソスクレアーゼで (0.6M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8.0)、12mM MgCl₂, 12mM CaCl₂, 10μg pLFW3 / B a i E II, 1.3u Ba131エキソスクレアーゼを含む反応液中、30℃、3分間反応) コートタンパク遺伝子の開始コドンの近くまで切り結めた。これに Sac I リンカーを接続した後、Sac I および Kpn I (TMVゲノムの4390番目に相当する部位) で消化した。コートタンパクの上流を含む1.25~1.35KbのSac I / Kpn I フラグメントをpUC18のSac I およびKpn I サイトの間にクローニングした。上記と同様に大腸菌を形質転換後、プラスミドを単離、DNA配列を決定し、TMVの3'0Kタンパク遺伝子、180Kタンパク遺伝子の一部およびコートタンパク遺伝子ATGに続く4bpを含むp15L29を選択した。

pCL29の構築:

p15L29の1.32KbのSac I / Kpn I

- 13 -

- 14 -

ン(CATの全
翻訳領域および
)を単離した。
V-Lの完全長
ベクターpLFW
生物学年會(1984)
TMV-Lのゲ
ノームを切断
し、4bp下
によりTMV
遺伝子の2
コピーをA
v
これらの2
2のBamH
Iで消化し、pC

2由来の
した後、
0.6M

BaI
C、
、12
0μg
31エ
、3分
ンの近
カーを
MVゲ
化した。
35
、UC
クロ
転換
、T
バク
TC
nI

フラグメント(180Kタンパク遺伝子の一部、
30Kタンパク遺伝子およびコートタンパク遺伝
子の開始コドンおよびその下流4bpを含む)、
pC3L5-2の0.963KbのSacI/
MluIフラグメント(CAT遺伝子およびその
上流10bp並びにTMVの3'末端領域を含む)
およびpLFW3のKpnI/MluIフラグメ
ントを結合しpCL29を構築した。
このpCL29は、pLFW3のTMVコートプ
ロテイン遺伝子領域をCAT遺伝子で置換された
構造を有する。

pCLB29の構築:
p5L29のSacI/KpnIフラグメント
およびpC3L5-2のSacI/MluIフ
ラグメントのSacIサイトをクレンワ
フラグメントでフィルアウトし平滑末端とした後、pCL
29構築と同様に結合しpCLB29を構築した。
ユニバーサル転写ベクターpLDCS29の構築:
コートタンパク遺伝子領域を除去し、この部分に
外来遺伝子の挿入を可能にする制限酵素切断部位

(1984)により転写した。得られたRNAをフ
ェノール抽出およびエタノール沈澱で精製した。
これを公知の酢酸法(Fraenkel-Conrat, H.,
Virology 4, 1-4(1957))で精製したTMVの普
通株のコートタンパク(4mg/ml)を用い
0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)
中で20℃で16時間処理しウイルス粒子再構成を
行った。

植物細胞への感染および発現:

上記のように再構築した反応液を緩衝液で5倍
に希釈し、Nicotiana tabacum Samsun の葉に塗
布した。10日栽培した後、葉を採集し抽出液
(250mM Tris-HCl (pH7.5)、
2.5mM EDTA、0.1%アスコルビン酸、
0.5mM DTP、1mM PMSF)を加
え、剪断し、60℃で10分間加熱した。遠心
分離(14,000 x g、5分)後、上清を緩衝液で
100μlとし5μlの10mMアセチルCoA
および0.067μCiの¹⁴Cラベルクロラム
フェニコール(53mCi/mmol; アマシヤ

(SacI)を導入したユニバーサル転写ベク
ターpLDCS29を以下のように構築した。

pLFW3をAvaIIで消化、クレンワフラ
グメントでフィルインした後、SacIリンカーを
接続し、SacIおよびMluIで消化し、
0.23KbのSacI/MluIフラグメント
(TMVの3'非翻訳領域およびコートタンパ
クのC末端22bpを含む)を単離した。
このSacI/MluIフラグメントをp5L
29から単離した1.32KbのSacI/Kp
nIフラグメントおよびpLFW3から単離した
KpnI/MluIフラグメント(大きい方のフ
ラグメントを使用)と結合し、コートタンパク遺
伝子の5710-6160番目が除かれSacI
サイトを挿入されたpLDCS29を構築した。
転写:

上記のように製造した転写ベクターpCL29、
pCLB29をMluIで消化後、大腸菌RNA
ポリメラーゼを用い公知法(Ahliquist et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7066-7070

ム)と混合し37℃で30分間インキュベートし
た。クロラムフェニコールおよびその誘導体を
酢酸エチルで抽出し、減圧下に乾燥した後、5μ
lの酢酸エチルに懸濁した。
この懸濁液をクロロホルム/メタノール(95:
5)を溶媒としシリカゲル薄層クロマトグラフ
イーにかけ、クロラムフェニコールおよびそのア
セチル誘導体(1AcCm:1-アセチルクロラ
ムフェニコール、3AcCm:3-アセチルクロ
ラムフェニコール、1,3AcCm:1,3-ジ
アセチルクロラムフェニコール)をオートラ
ジオグラフィー(室温、16時間)により検出し
た。結果を第6図に示す。この図中、レー
ン1は、未反応¹⁴Cラベルクロラムフェニコー
ル(Cm)、レーン2は、転写反応液を塗布して
ない対象植物の葉0.5mgの抽出物、レーン3は
野生株のTMVを感染させた植物の抽出物、レー
ン4は、コートタンパク遺伝子を有しない転写
ベクターpLDCS29の転写産物、レーン5およ
び6は、pCL29およびpCLB29の転写産

物を塗布した植物の抽出物のものである。レーン7は、0.03単位のCATの反応物のものである。

この結果から明らかなように、pCL29およびpCLB29によるCATの発現が確認された。

参考例

完全長のTMV-LのcDNAを含む転写ベクターpLFW3の構築：

TMV-RNAの完全長cDNAの合成

1) TMV-L株あるいは弱毒株L₁Aをタバコに接種し増殖させた。感染されたタバコを磨砕後、ウイルス粒子を公知の方法で精製し、次いでウイルス粒子からRNAを公知法 (Takamatsu et al. Nucleic Acids Res. 11, 3767-3778 (1983)) で精製した。このRNAを過剰の合成プライマー (TMV-RNAの3'末端の18残基に相補的な配列を有する。或いは、必要に応じ、3'末端の第9番目に相当するAをTに変換したものを使用) とアニールした。このアニールしたR

NAを用い、50μg/mlのアニールRNAおよび250単位/mlの逆転写酵素を含む反応液を調製、これを42℃、90分間反応しcDNAを合成した。フェノール抽出、エタノール沈澱によりDNAを回収後、0.1MNaOHによりRNAを分解した。これを5~20%フルカリーシ糖密度勾配遠心あるいは2.5%ポリアクリルアミド/8.3M尿素ゲル電気泳動にかけ完全長のRNAに相当するcDNAを分取した。上記のように合成した完全長cDNAに過剰の合成プライマー (TMV-RNAの1~19残基に相当する配列を有する) を加え10mMTris-HCl (pH7.5)、10mMMgCl₂、50mMNaCl中で、90℃で5分間加熱した後、徐々に冷却しアニールした。

このcDNAを10mMTris-HCl (pH7.5)、25mMNaCl、10mMMgCl₂、5mMジチオスレイトール、0.2mMの各dNTP中で250単位/mlの大腸菌DNAポリメラーゼIラジラグメントを加え

- 19 -

- 20 -

21℃で3時間反応し二本鎖cDNAに変換した。低融点アガロースゲルにより精製し完全長の二本鎖cDNAを得た。

完全長cDNAのクローニング

pUCG91の構築

pUC9のポリリンカー配列部位にMluIサイトを導入するために、pCG9F2 (Nesi et al. Virology 127, 54-64 (1983); cucumber green mottle mosaic virus のMluIサイトを含有約1.6Kbを含む) の0.21KbのHindIII/フィル-インMluIフラグメントをpUC9 (Vieira et al. Gene 19, 259-268 (1982) のHindIII/フィル-インSalIサイトへ挿入しpUCG91を構築した。

pUCG91のMluIサイト周辺の構造を第5図に示す。

TMV-L株の完全長cDNAを含むプラスミドpLFW1の構築

1) pLM51およびpLM31の構築

上記のようにして得られた完全長二本鎖cDN

A (TMV-L株) をBclIで消化し、RNAの5'末端部分に相当する2.62Kbを得た後、精製した。

これをpPM1のPmプロモーターを含む3.03KbのAatII/SmaIフラグメントおよびpUC9の0.47KbのAatII/BamHIフラグメントと結合した。結合したDNAをE. coli MC1061 (Casadaban et al.: J. Mol. Biol. 138, 179-207 (1980)) へ形質転換した。コロニーハイブリダイゼーションおよび制限酵素地図を作成し、第4図に示した構造のpLM51を含む大腸菌を選択した。

2) pLM31の構築

上記のようにして得られた完全長二本鎖cDNA (TMV-L 3'末端の第9番目のTがAへ変換された変異体のcDNA) をPstIで消化し、RNAの3'末端部分に相当する4.54Kbを得た後、精製した。

これをpUC9の2.18KbのAatII/PstIフラグメントおよびpUCG91の0.49

- 21 -

- 22 -

昭63-14693(6)

ルRNAお
含む反応液
しcDNA
ール沈澱に
によりR
アルカリ
ポリアク
にかけ完
了した。
過剰の合
9残基に
Tris
C₂、
加熱した

C₂(
0 mM
0.2
の大塩濃
トを加え

KbのAat II/ファイルインMlu Iフラグメントを結合した。結合したDNAをE. coli MC1061へ形質転換した。コロニーハイブリディーションおよび制限酵素地図を作成し、第4図に示した構造のpLM31を選択した。

3) pLFW1の構築

pLM31のPst Iサイトに、pLM51のPst Iフラグメント(Pmプロモーターおよび5'末端を含む。)を挿入することにより完全長cDNAを含むpLFW1を構築した。

pLFW3の構築

pLFW1のNco I/Apa IフラグメントをpL-1-13 (Takamatsu et al. Nucleic Acids Res. 11, 376-377B (1983) : 約1,600bpのTMV-L株の3'末端のcDNAを含む。)のNco I/Apa Iフラグメントで、Eco RI/Nco IフラグメントをpLT-D27 (Ohno et al.: J. Biochem. 96, 1915-1923 (1984) : TMV-L株RNAの5'末端から6215番までのcDNAを含む)のEco RI/Nco Iフ

ラグメントで置換することにより第4図に示した構造のpLFW3が得られた。

pLFA1の構築

上記と同様にpLFW1のEco RI/Apa IフラグメントをpL-1-A25のEco RI/Apa Iフラグメントで置換することによりTMV-L株の完全長cDNAを組み込んだ転写ベクターpLFA1を構築した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の転写ベクターpCL29構築の概略を示す図である。

図中Pmは、アールキストの開発したpPM1由来のメファージのプロモーターを表す。

130k/180K、30kおよびCPは、TMVの130k/180Kタンパク遺伝子、30Kタンパク遺伝子およびコートタンパク遺伝子を表す。その前後の四角で囲んだ5および3は、それぞれ5'末端非翻訳領域および3'末端非翻訳領域を表す。

第2図は、ユニバーサル転写ベクターpLDCS

- 23 -

- 24 -

RNA
得た後、

3.0
および
nH I
NAを
al.:
へ形質
および
3のp

DN
へ変
化し、
bを

29構築の概要を表す図である。

第3図は、CAT遺伝子を含む転写ベクターpCL29 (pCLB29)、転写ベクターpLDCS29およびTMVのRNAのcDNAを組み込んだ転写ベクターpLFW3のDNA構造を表す図である。

第4図は、プラスミドpLM31、pLM51、pLWF1、pLWF3、およびpL-1-13のDNA構造を表す図である。

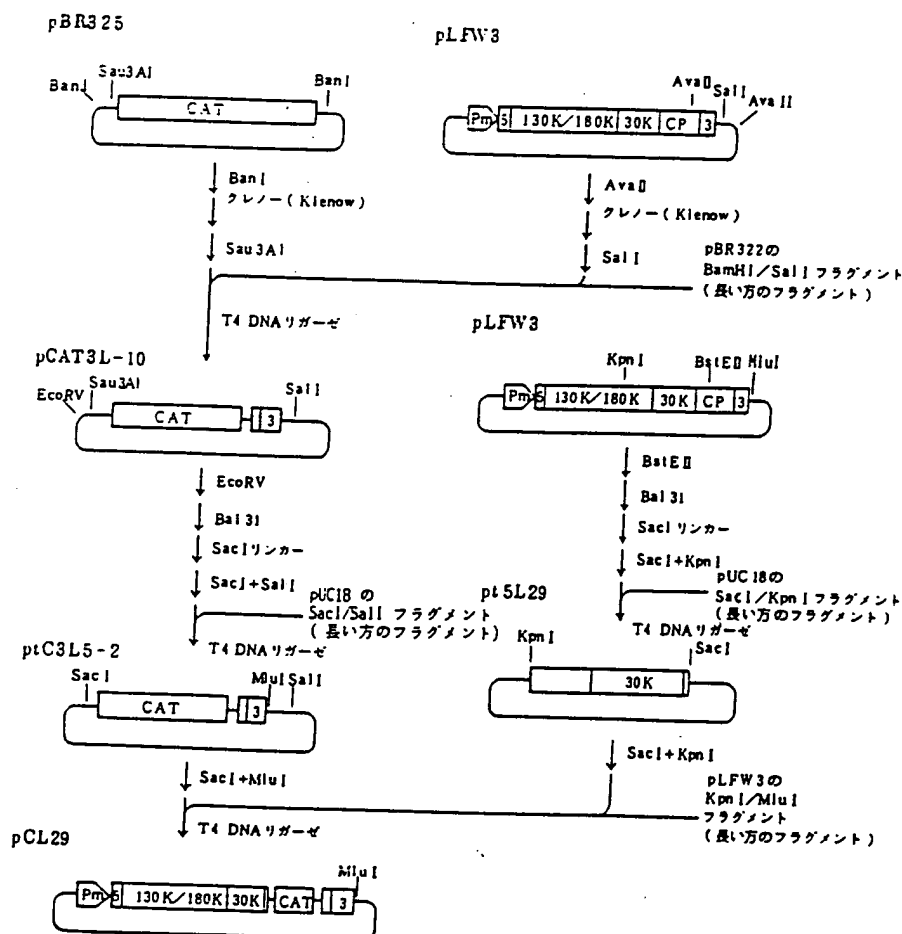
第5図は、pUCG91、pLFW1、pLFW3のMlu Iサイト周辺のDNA配列を表す図である。

第6図は、CATの発現を確認する実験におけるオートラジオグラフィーの結果を示す図である。

完

- 25 -

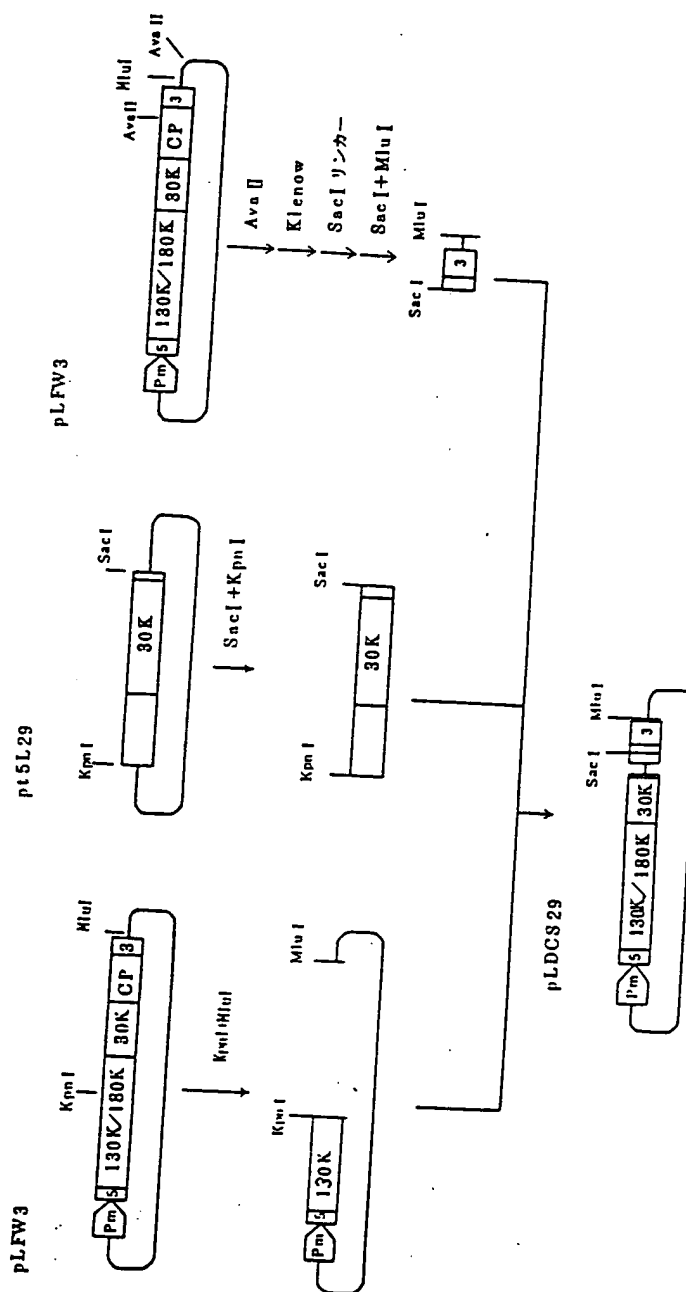
第 1 図



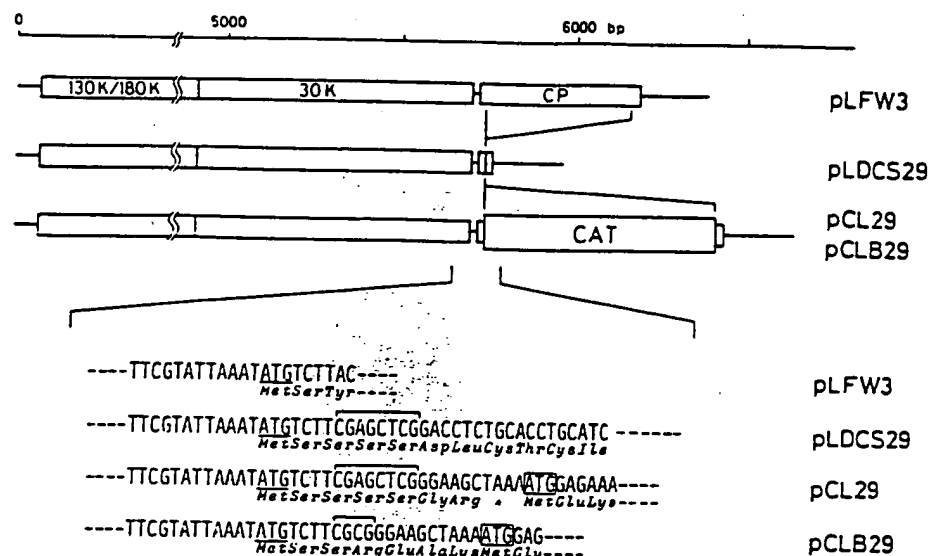
サグメント
ント)

サグメント
ント)

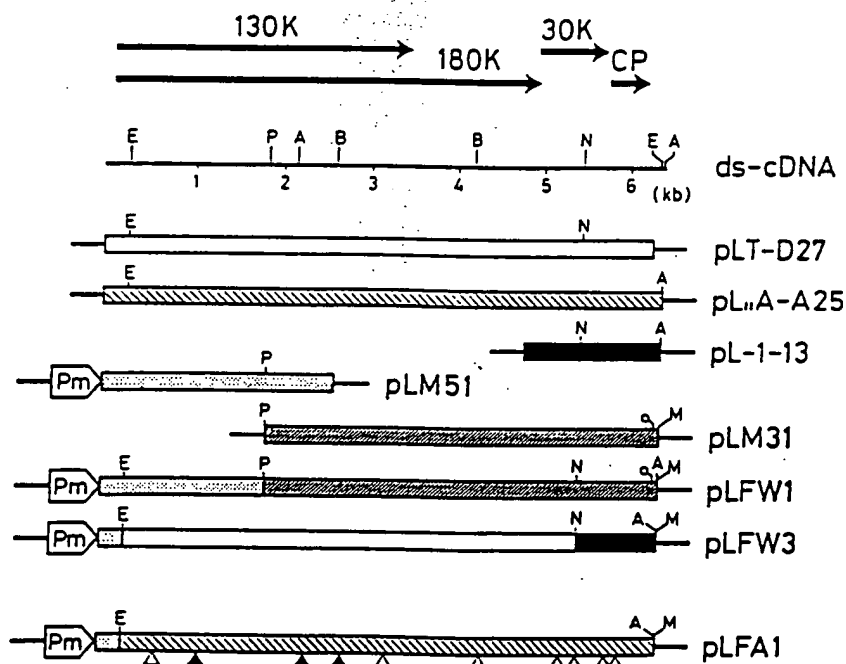
図 2



第 3 図



第 4 図



PLFW3

LDGS29

CL29

LB29

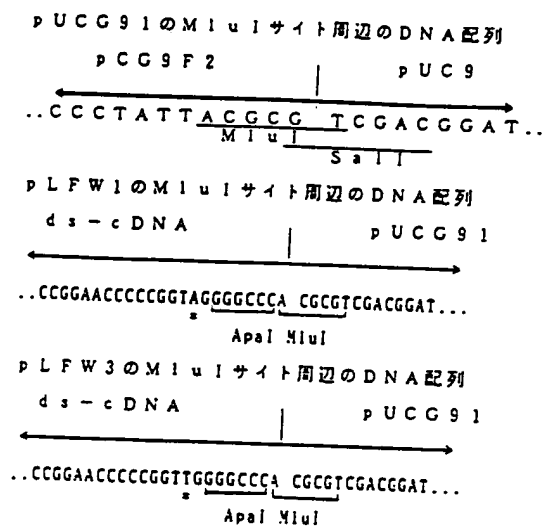
W3

CS29

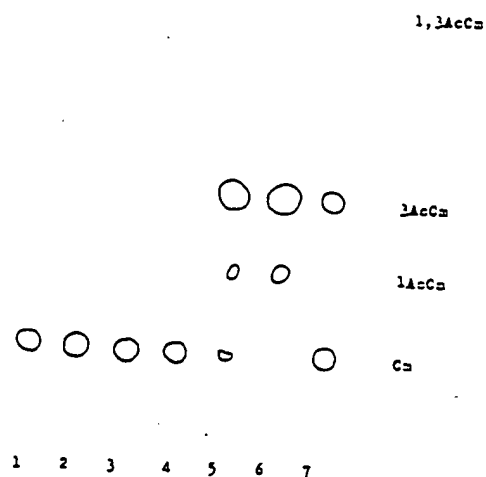
9

29

第5図



第6図



BEST AVAILABLE COPY